

Version: AC 5.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy RNA/DNA/miRNA/Protein Kit

组织细胞RNA/DNA/miRNA/protein分提试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1603

01/产品组分

序号	试剂盒组成	50 次 AC1603
1	裂解液 RLT Plus	50 mL
2	Wash Solution 1	12 mL 第一次使用前加入 28 mL 无水乙醇
3	Wash Solution 2/3	10 ml 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
4	RNase Free H ₂ O	10 mL
5	抑制物去除液 IR	25 mL
6	漂洗液 WB	15 ml 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇
7	缓冲液 APP	60 mL
8	洗脱缓冲液 EB	10 mL
9	基因组 DNA 吸附柱 DA 和收集管	50 套
10	RNA 吸附柱 RA 和 收集管	50 套
11	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

所有组分均室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

本试剂盒用于快速从同一个动物细胞或组织样品中同时提取基因组 DNA、包括 miRNA 的总 RNA 和 Protein。独特的裂解液能迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA/DNA 酶，然后裂解混合物 RNA/miRNA/DNA/Protein 同时通过一个基因组 DNA 吸附柱，基因组 DNA 被吸附而 miRNA/RNA/Protein 穿透滤过。DNA 吸附柱上基因组 DNA 经过一系列漂洗、离心步骤后洗脱得到纯净的基因组 DNA。滤过的 miRNA/RNA 用乙醇调节结合条件后，miRNA/RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于 miRNA/RNA 吸附柱上，再通过一系列快速

的漂洗、离心洗脱步骤得到纯净的 miRNA/RNA。滤液经选择性沉淀得到 Protein。无苯酚、氯仿的 DNA/RNA 快速提取技术配合独特的分离技术，得到高纯度的 miRNA/RNA/基因组 DNA 纯度高。得到的 miRNA/RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。基因组 DNA 也可以直接用于下游的 Southern、酶切、PCR 等各种实验。该产品可在 80 min 内完成样品 DNA/RNA/Protein 的提取。

04/自备材料

无水乙醇、胰蛋白酶（用于细胞）

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 试剂盒内所有溶液都应是澄清的，低温环境中溶液可能形成沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，待恢复澄清后使用。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 的处理能力，否则会造成 DNA 残留或产量降低。不同的组织细胞 RNA/DNA 相差极大，例如胸腺、脾脏 DNA 含量丰富，超过 5 mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 3×10^6 个细胞就会超过吸附柱吸附能力。因此，若不清楚样品的 DNA/RNA 含量，可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3-4 \times 10^6$ 个，组织不超过 10 mg，再根据实验情况增加或减少样品量。
- ◇ 裂解液 RLT Plus、抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或生理盐水冲洗。

06/使用方案

1. 样本处理

◆ 组织培养细胞

- a. 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5 mL 离心管，对于贴壁细胞，孔板培养可以直接裂解，细胞瓶培养应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 12,500 rpm（14,500×g）离心 10 s（或者 300×g 离心 5 min），使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。
- c. 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬，加 350 μL（ $<5 \times 10^6$ 细胞）或 600 μL（ $5 \times 10^6-1 \times 10^7$ 细胞）裂解液 RLT Plus，吹打混匀后

用手剧烈振荡 20 s 充分裂解。

- d. 匀浆：（处理细胞量极少时 $<1 \times 10^5$ 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆）。用移液器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞吸附柱和提高产量。
- e. 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 吸附柱上（吸附柱放在收集管内）。
- f. 接操作步骤 2。

◆动物组织（例如鼠肝脑）

- a. 电动匀浆：新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块，加入 350 μL (<20 mg 组织) 或者 600 μL (20-30 mg 组织) 的裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 20-40 s。
- b. 液氮研磨、匀浆：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉 (20 mg/30 mg) 转入装有 350 μL /600 μL 组织裂解液 RLT Plus 的 1.5 mL 离心管中，用手剧烈振荡 20 s，充分裂解。用移液器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞吸附柱和提高产量。
- c. 将匀浆后裂解物 12,500 rpm (14,500 $\times g$) 离心 3 min，沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物，将裂解物上清全部加到 DNA 吸附柱上（吸附柱放在收集管内）。
- d. 接操作步骤 2。

2. 12,500 rpm (14,500 $\times g$) 离心 30 s，保留滤过液（miRNA/RNA/Protein 在滤过液中）。DNA 吸附柱（膜上吸附有基因组 DNA）短时间可存放 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

▲确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

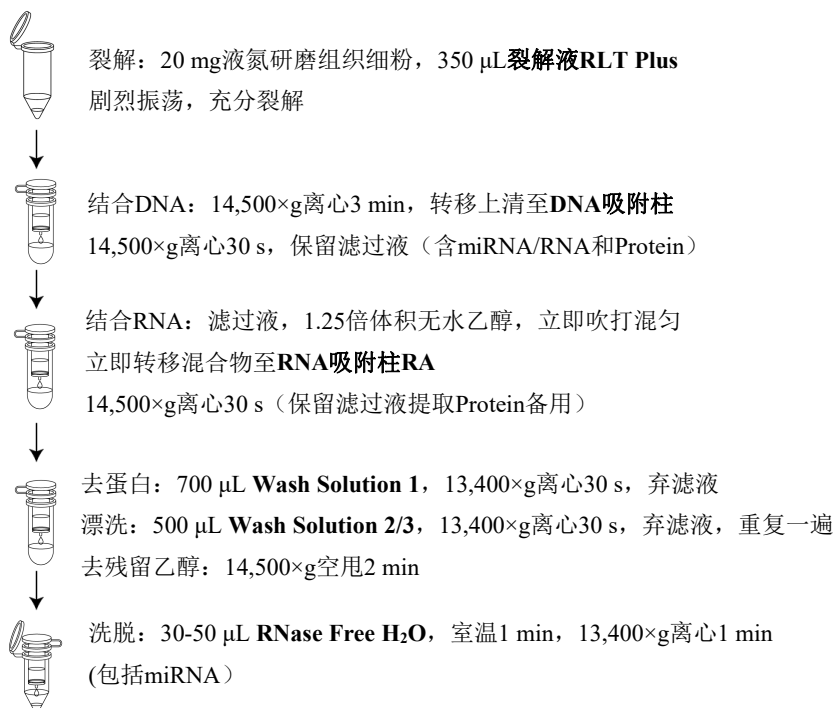
▲将 DNA 吸附柱放回收集管保留在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，备用于步骤 10 开始的基因组 DNA 提取。

以下步骤为提取 RNA 步骤：

3. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (350 μL 或者 600 μL 左右，滤过时候损失体积应该减去)，加入 1.25 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
4. 立刻将混合物(每次小于 700 μL ，可以分两次加入)加入一个 RNA 吸附柱 RA 中(吸附柱放入收集管中)，12,500 rpm (14,500 $\times g$) 离心 30 s，保留滤过液以备提取 Protein。
- ▲滤过液含有 Protein，请转入一个合适大小（至少 2 倍滤过液体积）的离心管，用于从步骤 16 开始的 Protein 提取。
5. 加 700 μL Wash Solution 1（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm (13,400 $\times g$) 离心 30 s，弃废液。
6. 加入 500 μL Wash Solution 2/3（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm (13,400 $\times g$) 离心 30 s，弃废液。重复此步骤。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm (14,500 $\times g$) 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase Free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μL RNase Free H_2O ，室温放置 1 min，12,000 rpm (13,400 $\times g$) 离心 1 min。

9. 得到的 RNA 可以立即用于下游反应或尽快置于低温保存。

◇ RNA 提取方法



以下步骤为提取 DNA 步骤:

10. 在步骤 2 的 DNA 吸附柱上加入 500 μ L 抑制物去除液 IR, 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s, 弃废液。
11. 加入 700 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s, 弃废液。
12. 加入 500 μ L 漂洗液 WB, 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s, 弃废液。
13. 将 DNA 吸附柱放回空收集管中, 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 取出 DNA 吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100 μ L 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温放置 3-5 min, 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1 min。
▲洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 若需要较高浓度的 DNA, 可以适当减少洗脱体积, 但最小体积不应少于 50 μ L, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
15. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在-20 $^{\circ}$ C。

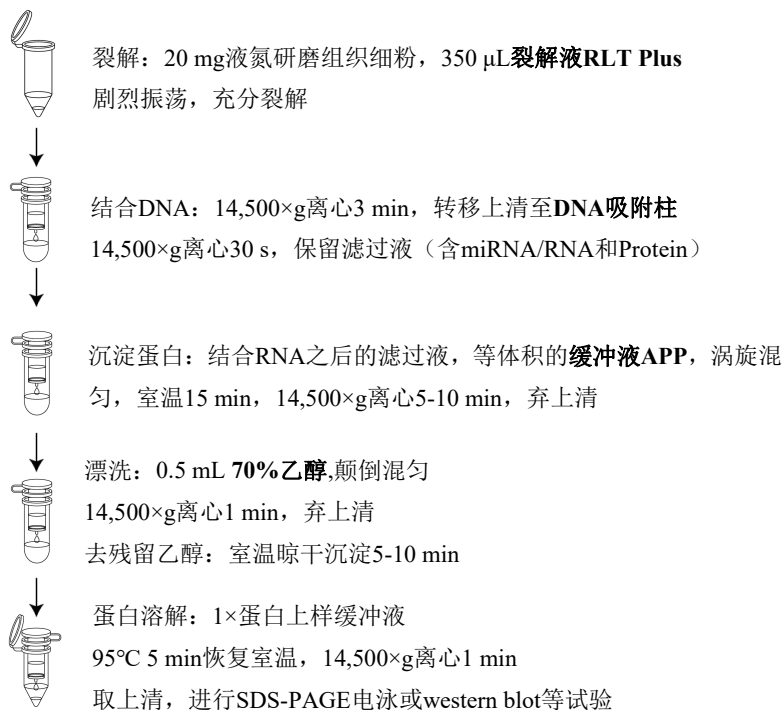
◇ DNA 提取方法



以下步骤为提取 Protein 步骤:

16. 将步骤 4 的滤过液中加入等体积的缓冲液 APP, 涡旋振荡混匀, 室温放置 15 min 沉淀 Protein。
17. 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 5-10 min, 弃上清。加入 0.5 mL 70%乙醇, 颠倒后离心 1 min, 弃上清, 留下蛋白沉淀, 尽量将残留液体用移液器吸干净。室温晾干沉淀 5-10 min, 注意一定让乙醇挥发干净, 以免下游实验受影响。
18. 将蛋白沉淀溶解于 30-150 μ L 1 $\times$ 蛋白上样缓冲液 (如需要蛋白定量, 缓冲液中不应该加入溴酚兰) 或其它下游实验要求的缓冲液中。
▲ 由于裂解液 RLT Plus 强变性作用或者不同蛋白等电点, 蛋白可能溶解比较困难, 用移液器吹打帮助溶解或者改变 PH 值帮助蛋白溶解, 短暂离心取上清使用。或者用 5% SDS 或者 8 M 尿素帮助溶解蛋白沉淀后做蛋白定量。注意如果需要 BCA 蛋白定量可能需要把 8 M 尿素稀释到 3 M。
19. 95 $^{\circ}$ C 放置 5 min 溶解和变性蛋白, 恢复到室温, 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 1 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳或者 western blot 等实验。

◇ 蛋白提取方法



07/相关产品

- AA1002 SPARKeasy 组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒 (含蛋白酶 K)
- AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (含基因组 DNA 清除柱)
- AC1501 SPARKeasy 动物组织细胞 microRNA 快速提取试剂盒
- AC1502 SPARKeasy 植物 microRNA 快速提取试剂盒
- EA0004 RIPA 裂解液 (弱)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

